

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (2)

April 2018

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=419&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Taxas de sobrevivência e contaminação de segmentos nodais de três variedades de *Hancornia speciosa* em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão

### Survival rates and contamination of nodes three varieties of *Hancornia speciosa* in different concentrations of sodium hypochlorite and immersion times

A. P. M. Belo<sup>1</sup>, M. C. Vieira<sup>2</sup>, H. O. Guimarães<sup>1</sup>, T. C. Oliveira<sup>1</sup>, Y. S. Mascarenhas<sup>1</sup>, E. R. B. Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Goiânia

<sup>2</sup> Instituto Federal Goiano Campus Urutaí-GO

**Author correspondence:** [mcvmuza@gmail.com](mailto:mcvmuza@gmail.com)

**Resumo:** O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um protocolo para a desinfecção e sobrevivência *in vitro* de explantes de diferentes variedades de *Hancornia speciosa* Gomes. Ápices caulinares de três variedades de *H. speciosa*, contendo segmentos nodais, foram coletados e transportados ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás - UFG. Neste local, as folhas foram retiradas e os segmentos nodais submetidos à assepsia em álcool 70%, por 2 minutos, seguida da imersão em Hipoclorito de Sódio (NaClO), produto comercial água sanitária Ki Jóia® em concentração de 1,0%; 1,5% e 2,0% durante 5 ou 10 minutos. Foram avaliadas taxas de contaminação, oxidação; tipos de microrganismos contaminantes; brotações vivas; brotações mortas; explantes vivos e número de par de folhas. As diferentes variedades se manifestaram diferentes quanto ao processo de desinfestação e sobrevivência. É possível o cultivo *in vitro* de explantes de segmentos nodais de *H. speciosa* oriundas do campo.

**Palavras-chave:** Cerrado, frutas, mangaba, micropropagação

**Abstract:** The objective of this research was to develop a protocol for the disinfection and *in vitro* survival of explants from different varieties of *Hancornia speciosa* Gomes. Shoot tip containing nodal segments of three varieties of *H. speciosa*, they were collected and transported to the Tissue Culture Laboratory vegetables of Agronomy of the Federal University of Goiás - UFG. In this place, the sheets were removed and subjected to aseptic nodal in 70% alcohol for 2 minutes, followed by immersion in sodium Hypochlorite of the Sodium, commercial product bleach KiJóia® concentrations of 1.0%; 1.5% to 2.0% for 5 or 10 minutes. Infection rates were evaluated, oxidation; types of contaminating microorganisms; living shoots; shoots dead; living explants and pair of leaf number. Different varieties have spoken out about the different disinfection and survival process. It is possible the cultivation *in vitro* explants *H. speciosa* nodal coming from the field.

**Keywords:** Savannah, fruits, mangaba, micropropagation

## Introdução

O Cerrado é o Bioma mais característico e próprio do Brasil por sua biodiversidade vegetal (Ribeiro & Walter, 2008). As diversas formas e usos contidos neste bioma têm grande importância para populações rurais e seu manejo sustentável, possui grande potencial para se tornar elemento estratégico à conservação deste ecossistema. A *Hancornia speciosa* (Gomes) é uma frutífera da família das Apocináceas, com plantas que compreendem 5 a 10 metros de altura. Nativa do

Brasil ocorre desde os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, até as áreas sob Cerrado das Regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Planta de clima tropical, na região dos cerrados floresce de agosto a novembro e em Goiânia-GO, de junho a dezembro (Vieira, 2014) também, com pico em outubro. A frutificação concentra-se principalmente de outubro a dezembro (Soares et al., 2007; Vieira, 2014).

A propagação da *H. speciosa*, realizada por sementes é responsável pela manutenção da

diversidade genética da espécie, todavia, para aqueles produtores que desejam plantas com características específicas, semelhantes às de determinadas matrizes, a propagação assexuada é uma importante alternativa (Silva Júnior & Lêdo, 2006).

A cultura de tecidos apresenta a possibilidade de superar as dificuldades da propagação vegetativa, pois essa ferramenta biotecnológica é capaz de produzir indivíduos iguais aos seus genitores, com a mesma carga genética, em grande quantidade, curto espaço de tempo e com qualidade fitossanitária superior, o que pode auxiliar na produção de mudas, especialmente de plantas frutíferas nativas do Cerrado.

O desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento *in vitro*, visando busca por materiais geneticamente iguais aos genitores são importantes. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo desenvolver um protocolo para a desinfecção e a avaliação da taxa de sobrevivência *in vitro* dos explantes de diferentes variedades de *H. speciosa*, para que se possam entender esses processos, bem como servir de subsídios para novos estudos.

## Métodos

O trabalho foi realizado com as plantas matrizes de *H. speciosa* em idade reprodutiva, pertencentes ao Banco de Germoplasma da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFV), localizado no município de Goiânia, GO, nas coordenadas geográficas de latitude 16°35'12" S, longitude 49°21'14" W e 730 m de altitude. Foram utilizados como fonte de explantes, segmentos nodais com até três gemas em ramos produzidos no ano, das progêneses de plantas nativas de *H. speciosa* das variedades botânicas *pubescens*, *gardneri* e *cuyabensis*. Após coletados, os segmentos foram colocados em sacos plásticos e depositados em caixa de isopor para minimizar os efeitos da desidratação.

Logo após a coleta, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, o material vegetal, foi submetido ao protocolo de desinfecção com água corrente e sabão líquido neutro, seguido de três enxágues. As folhas foram retiradas e os segmentos submetidas à desinfecção em álcool 70%, por 2 minutos, seguido da imersão em Hipoclorito de Sódio (NaClO), produto comercial água sanitária Ki Jóia® em diferentes tempos e concentrações. Os tratamentos foram: Variedade x tempo x concentração de Hipoclorito de Sódio: *Hancornia speciosa* var. *pubescens*, ou *gardneri*, ou *cuyabensis* imergidos durante 5 minutos em NaClO a 1,0%; 1,5% e 2,0%, constituindo os tratamentos T1= 5+1,0%; T2= 5+1,5% e T3= 5+2,0%, ou imersão em NaClO por 10 minutos e concentração de 1,0%; 1,5% e 2,0%, constituindo os tratamentos T4= 10+1,0%; T5= 10+1,5% e T6= 10+2,0%. Cada tratamento foi composto por cinco repetições com

três (3) frascos contendo um segmento nodal cada repetição

Em câmara de fluxo laminar foi realizada o enxágue em água estéril por 4 vezes. Logo após, os segmentos foram excisados por bisturi com lâmina de nº4 e inoculados em frascos de 268 mL, contendo 30 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade (1/2) da concentração dos sais, mais as vitaminas do meio e 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 1,0 g L<sup>-1</sup> carvão ativado; 1,0 g L<sup>-1</sup> de tryptona; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de benzylaminopurina; 0,5 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico; 3,5 de ágar em pH 5,7 e autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

Os frascos foram fechados com tampa de polipropileno e vedados com filme de policloreto de polivinila (PVC) transparente e transportados para a sala de crescimento, permanecendo na ausência de luz por 72 horas para evitar a incidência de oxidação. Logo após este período, foram mantidas sob luz branca, com fotoperíodo de 16 horas e 40 µmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 26 ± 2 °C até o 32º dia após a inoculação.

As variáveis analisadas foram taxa de contaminação e de sobrevivência aos 8º DAI. Aos 32º foi realizada avaliação final para da taxa contaminação, oxidação; tipos de microrganismos contaminantes; número de brotações por explantes (Brot./Expl.); senescência das brotações (Senes. Brot.); explantes sobreviventes (Expl./Sobreviv) e número de par de folhas (NPF). Os dados foram analisados pelo programa Assistat 7.7. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise de variância foram cumpridos os pressupostos de normalidade e homogeneidade.

## Resultados e discussão

A partir das primeiras avaliações (**Figura 1-A**), pode-se constatar que não houve diferença significativa entre os tratamento T1, T2, T3, T5 e T6, quando se avalia a taxa de sobrevivência para os explantes da var. *cuyabensis*. A taxa de sobrevivência é relevante especialmente quando o propósito é o estabelecimento da cultura, pois, a partir de um único explante, pode ser possível dependendo da espécie, obter um número expressivo de clones, o que pode contribuir para a conservação da espécie em banco de germoplasma *in vitro*, bem como, para a propagação massal desses indivíduos.

Quanto à taxa de contaminação (**Figura 1-B**), é possível perceber que o Tratamento T1 divergiu estatisticamente dos demais tratamentos, levando a inferir sobre a necessidade da utilização de concentrações maiores de agentes desinfectantes, associados também a maiores tempos de exposição do explantes para uma assepsia mais eficiente. Vieira et al. (2013) em estudos com o estabelecimento de estacas lenhosas de *Rubus* spp *in vitro*, observou que a desinfecção com NaClO na dose de 2,5% não foi eficiente para assepsia das estacas, ocorrendo

80,0% de contaminação. Eles também argumentam que o tempo de imersão e a concentração do agente desinfetante pode ser determinante para uma assepsia efetiva, sobretudo em espécies lenhosas oriundas do campo.

Em explantes de *H. speciosa* da variedade *gardneri* (**Figura 2-A**), foram observadas diferenças estatísticas entre tratamentos T1, T2, T6 e T3, T5 e T4, quando se avalia a sobrevivência. As porcentagens variaram de 86,0% (T2), a 62,5% (T4), nas diferentes concentrações de NaClO estudadas.

Quanto a contaminação (**Figura 2-B**) constata-se que as diferenças estatísticas ocorreram de forma gradativa e proporcional às concentrações e tempos de imersão. Esse fato comprova que a utilização de agentes desinfeciosos podem ser importantes ferramentas para a diminuição de inóculos patogênicos em *H. speciosa*. É relevante salientar que os diferentes tempos de imersão e concentrações de NaOCl, associados a variedade em estudo, podem ter concorrido para que houvesse essa amplitude de valores entre os tratamentos.

Em abordagem de Bianchi et al. (2003), sobre estudos com a imersão de meristemas de marmeleiro em NaClO a 1,5% por 10 minutos, esses autores observaram o menor percentual de contaminação e as maiores taxas de sobrevivência, quando comparados com os outros tratamentos.

Ao se observar a variedade *pubescens* (**Figura 3-A**) é importante ressaltar que houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Percebe-se que o tratamento T1 e T2, apresentaram as melhores taxas de sobrevivência (84,6%), na concentração de 1,0% e 1,5% de NaClO e tempo de imersão de 05 minutos. As médias de sobrevivência variaram de 76,0% a 24,0% entre os Tratamentos T5, T6 e T3 para o fenômeno em questão. As respostas de desenvolvimento *in vitro* são segundo Hu & Ferreira (1998) regidas pela constituição genética, nesse sentido é possível que fatores relacionados não só as variações genéticas, mas, ao ambiente de cultivo tal qual a composição do meio e o tratamento de desinfecção, podem ter contribuído quanto a esse resultado para a variedade *pubescens*. Quanto a taxa de contaminação (**Figura 3-B**) houve diferença significativa com as maiores porcentagens verificadas nos tratamentos T1, T2 e T4 cujas proporções do NaOCl foram entre 1,0% e 1,5%). Esse fato pode se justificar pela menor ação germicida do agente desinfetante, que apresenta uma melhor eficiência com o aumento do agente, bem como do tempo de exposição do material estudado.

A sobrevivência dos explantes (**Tabela 1-A**) apresentou diferença significativa entre as três variedades estudadas, dadas as características morfológicas existentes entre elas. Diferenças estatísticas também foram observadas nas

interações entre as variedades e concentrações de NaClO e tempos de desinfecção. Esta última associação proporcionou maior sobrevivência, para os explantes tratados com maiores concentrações e tempos de desinfecção, apesar de algumas repetições apresentarem contaminantes.

Ao se observar a análise de variância obtida (**Tabela 1-B**) a partir dos dados coletados constatou-se que a contaminação dos explantes por fungos diferiu estatisticamente para as três variedades de *H. speciosa* avaliadas, assim como as interações entre as variedades e as concentrações de NaOCl e os tempos de desinfecção. Este fato pode ser justificado pela diferença genética encontrada entre as variedades estudadas, o que confere características fenotípicas distintas entre elas.

Os valores das taxas e tipos de microrganismos contaminantes por variedade (**Tabela 2**) revelam diferenças estatísticas entre as variedades e que a maior proporção por explante foi observado na var. *pubescens* (61,11%). Os agentes mais incidentes foram os do gênero *Fusarium* sp, seguido por *Cladosporium* sp, *Penicilium* sp, *Rhizopus* sp. e *Verticillium* sp. Observou-se durante a condução do experimento a presença de tricomas em *Hancornia speciosa* sub. *pubescens*. Esta alta pilosidade (sub. *pubescens*) pode contribuir para a formação de condições favoráveis a proliferação de microrganismo contaminante, justificando a maior taxa desse evento na variedade em questão. A contaminação por microrganismos continua sendo hoje em dia um dos principais problemas para os micropropagadores de plantas no mundo e para que se possa estabelecer e desenvolver protocolos para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, as identificações desses fitopatógenos na cultura são importantes (Cassels, 2000). Ao mesmo tempo em que esses agentes podem comprometer o processo de micropropagação em culturas já estabelecidas, cumpre dizer ainda, que são poucos os estudos sobre a atuação desses agentes em frutíferas nativas do Cerrado. É necessário que se desvende não só a ação e forma de contenção deles, mas, se pesquisem sobre a possibilidade desses mesmos agentes se tornarem organismos que possam contribuir para o processo de aclimatização dessas espécies.

Segundo Amorin et al. (2011) avaliando a eficiência da desinfecção de sementes de *H. speciosa* em diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (NaClO = 0,00%, 10,0%, 20,0%, 30,0%, 40,0%) percebeu um índice de contaminação de 75,0%, 75,1%, 79,00%, 86,0% e 100,0%, respectivamente, não sendo mencionada neste trabalho a variedade pesquisada e os microrganismos contaminantes incidentes.

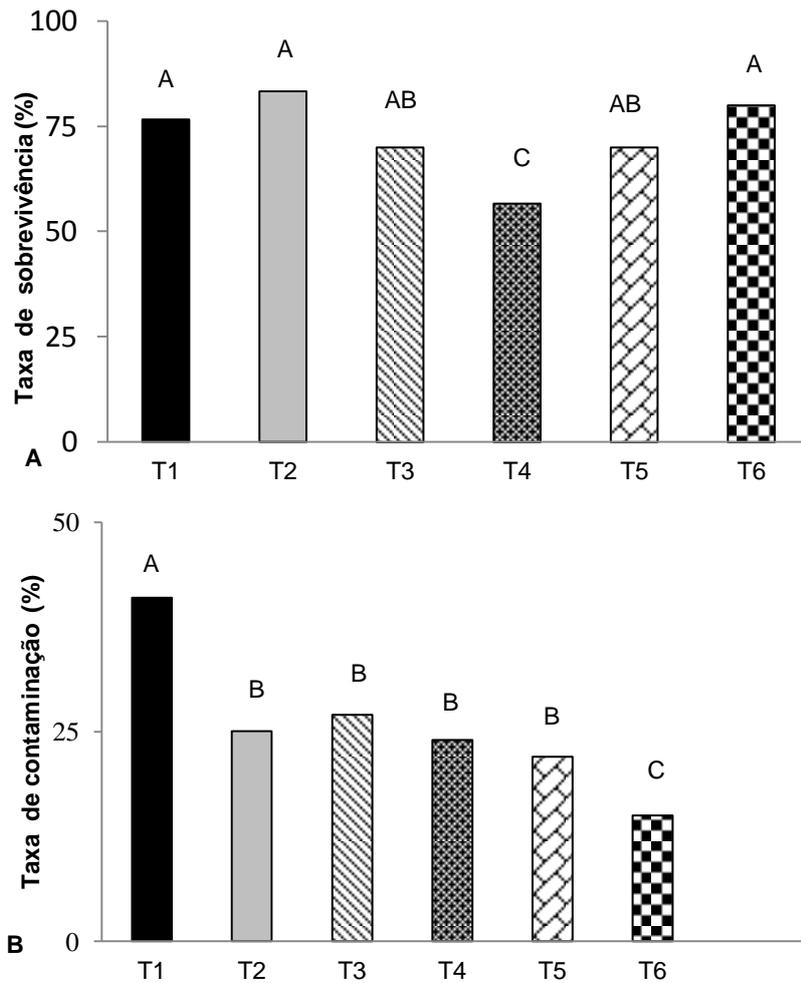


Figura 1. Média para Taxas de Sobrevivência (Sobrev.) (A) e Contaminação (Cont.) (B) em segmentos nodais de *H. speciosa* var. *cuyabensis* quando submetidos à diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio em diferentes tempos de imersão em meio de cultura MS, aos 8 dias de estabelecimento. Goiânia, GO, 2014.

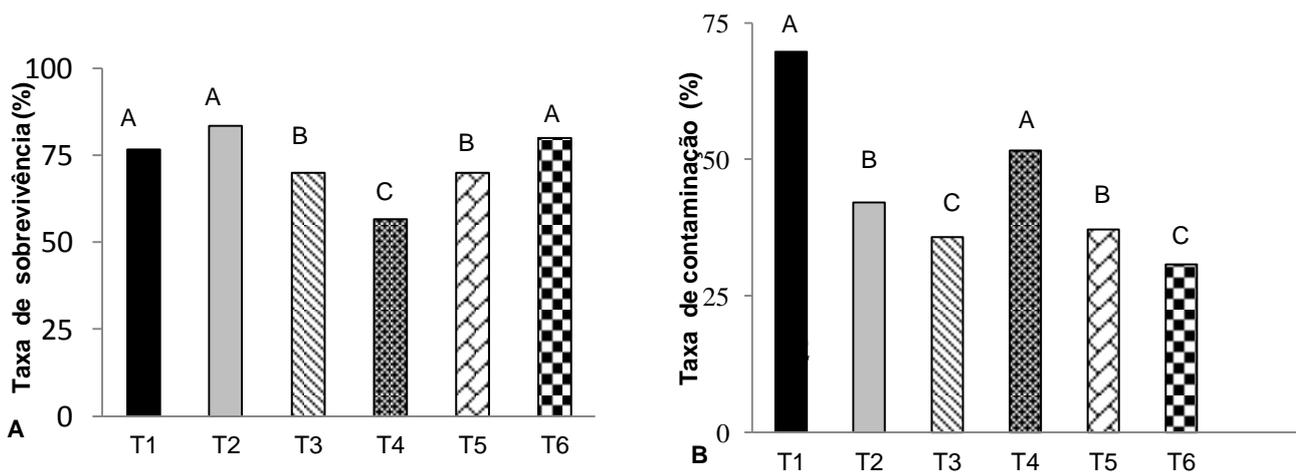
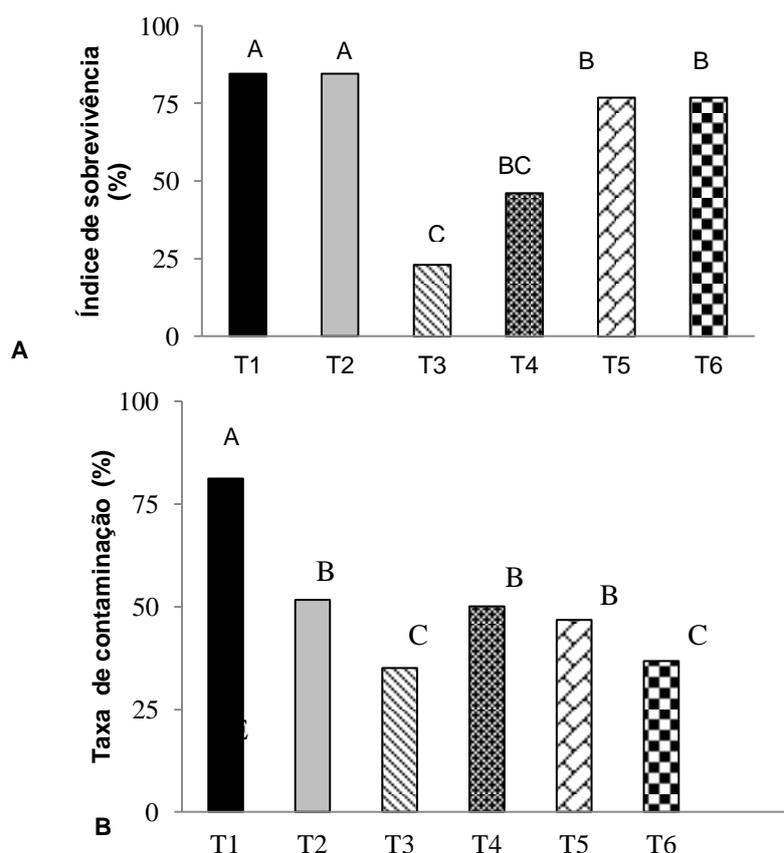


Figura 2. Média para Taxas de Sobrevivência (Sobrev.) (A) e Contaminação (Cont.) (B) em segmentos nodais de *H. speciosa* var. *gardneri* quando submetidos à diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio em diferentes tempos de imersão em meio de cultura MS, aos 8 dias de estabelecimento. Goiânia, GO, 2014.



**Figura 3.** Média para Taxas de Sobrevivência (Sobrev.) **(A)** e Contaminação (Cont.) **(B)** em segmentos nodais de *H. speciosa* var. *pubescens* quando submetidos à diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio em diferentes tempos de imersão em meio de cultura MS, aos 8 dias de estabelecimento. Goiânia, GO, 2014.

**Tabela 1.** Análise de Variância para a taxa de sobrevivência (A) e de contaminação (B) de explantes de três variedades de *H. speciosa* em diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio e dois tempos de desinfecção, aos oito dias após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.

FV	Sobrevivência <b>(A)</b>		Contaminação <b>(B)</b>	
	GL	F	GL	F
Fator (1) Variedade	2	13,7 **	2	443,5**
Fator (2) Concentração	2	2,2 --	2	19,7
Fator (3) Tempo	1	2,1 ns	1	3,7 ns
Int. F1xF2	4	2,8 *	4	4,1**
Int. F1xF3	2	2,5 ns	2	7,4 **
Int. F2xF3	2	4,4 *	2	2,6 ns
Int. F1x F2xF3	4	0,6 *	4	1,2 ns
Tratamentos	17	3,6**	17	8,1**
Erro	72		72	
Total	89		89	

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ); ns não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores médios quanto as taxas e tipos de agentes contaminantes *Fusarium* (FUS), *Rhizopus* (RHY), *Cladosporium* (CLAD), *Penicillium* (PEN), *Verticillium* (VERTC) e da taxa de contaminação e oxidação em segmentos nodais de *H. speciosa* var. *cuyabnesis gardneri*, *pubescens* estabelecidas *in vitro* aos 32 dias após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.

	Tipos de agentes contaminantes (%)				
	FUS	RHY	CLAD	PEN	VERTC
<i>pubescens</i>	61,11a	2,22a	30,00a	21,11a	2,22a
<i>gardneri</i>	32,22b	1,11b	12,22b	4,44b	0,00
<i>cuyabensis</i>	22,22b	1,11b	12,22b	5,56b	0,00

Média seguida pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

**Tabela 3.** Taxa de contaminação e oxidação em segmentos nodais de *H. speciosa* var. *cuyabnesis*, *gardneri*, *pubescens* estabelecidas *in vitro* aos 32 dias após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.

Variedade	Contaminação	Oxidação
<i>gardneri</i>	0,1 c	0,0
<i>cuyabensis</i>	0,2 b	0,0
<i>pubescens</i>	0,4 a	0,0

Média seguida pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

Na **Tabela 3** constata-se que houve diferença significativa entre as variedades e que a var. *pubescens* foi a que mais apresentou índice de contaminação em comparação com as var. *gardneri* e *cuyabensis*. Esta averiguação leva a inferir sobre a utilização de procedimentos assépticos que contemplem maiores concentrações de agentes desinfestantes, no caso, de NaClO associados a maiores tempos de exposição do tecido, para que se possa tentar obter uma cultura mais axênica em cultivo *in vitro*. Outras metodologias como a utilização de agentes quimioesterilizantes também podem ser alternativas viáveis na tentativa da obtenção de explantes livres de microrganismos contaminantes. Quanto à oxidação não foram verificadas a manifestação desse fenômeno na pesquisa em questão. Este fato ocorrido, talvez seja pela utilização do ácido cítrico e, ou, carvão ativado no meio de cultura. O carvão ativado possui a propriedade de adsorver compostos fenólicos, permitindo a cauligênese do explante sem que apareça a oxidação (Barrueto Cid, 2010).

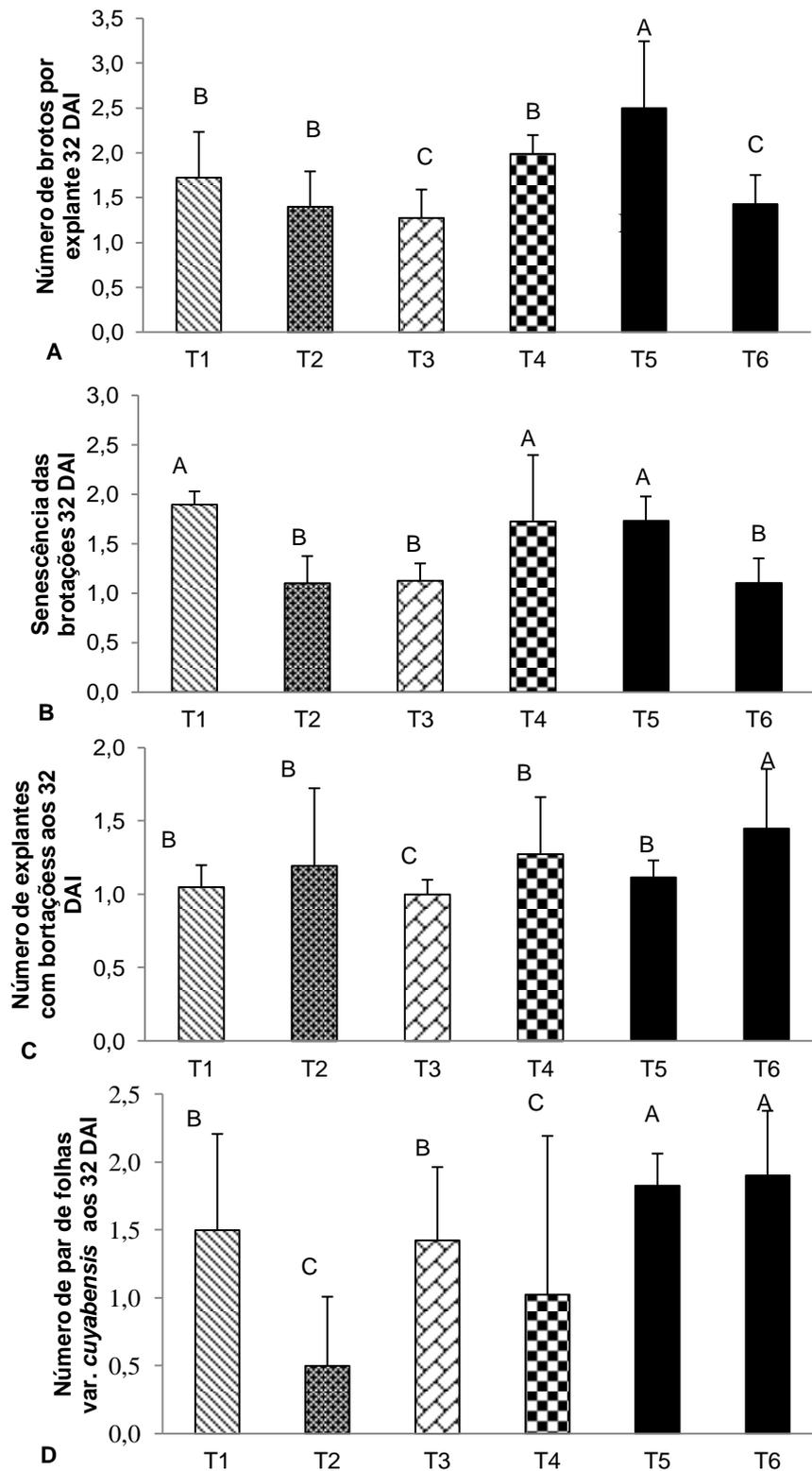
O número de brotações (Brot./Expl.), para a var. *cuyabensis* iniciaram-se a partir do 14<sup>o</sup> dia após a inoculação (DAI), se estendendo até o 48<sup>o</sup> DAI, quando foi observada a manifestação expressiva da perda das folhas das brotações. Dados referentes à manifestação da organogênese direta *in vitro* de *H. speciosa* podem ser observados na **Figura 4-A**, a diferença significativa quanto ao número de brotos por explantes, foi constatado para o T5 com 2,5 e os tratamentos T1 (1,72), T2 (1,40), T3 (1,28), T4 (1,99) e T6 1,46. A senescência das brotações (Senes. Brot.), (**Figura 4-B**) foram semelhantes nos tratamentos T1, T4 e T5 e divergentes dos

tratamentos T2, T3 e T6, sendo estes, semelhantes entre si. A média geral de brotação foi de 1,44 e a amplitude entre o valor máximo (T1=1,90) e mínimo (T2=1,10) foi 58,0%. Já para o número de explantes com brotações (Expl./Brot.) e número de par de folhas (NPF) (**Figura 4-C, D**) também foram observadas diferenças entre eles com o tratamento T6 apresentando as taxas de 1,8, explante; a média geral de NPF foi de 1,34.

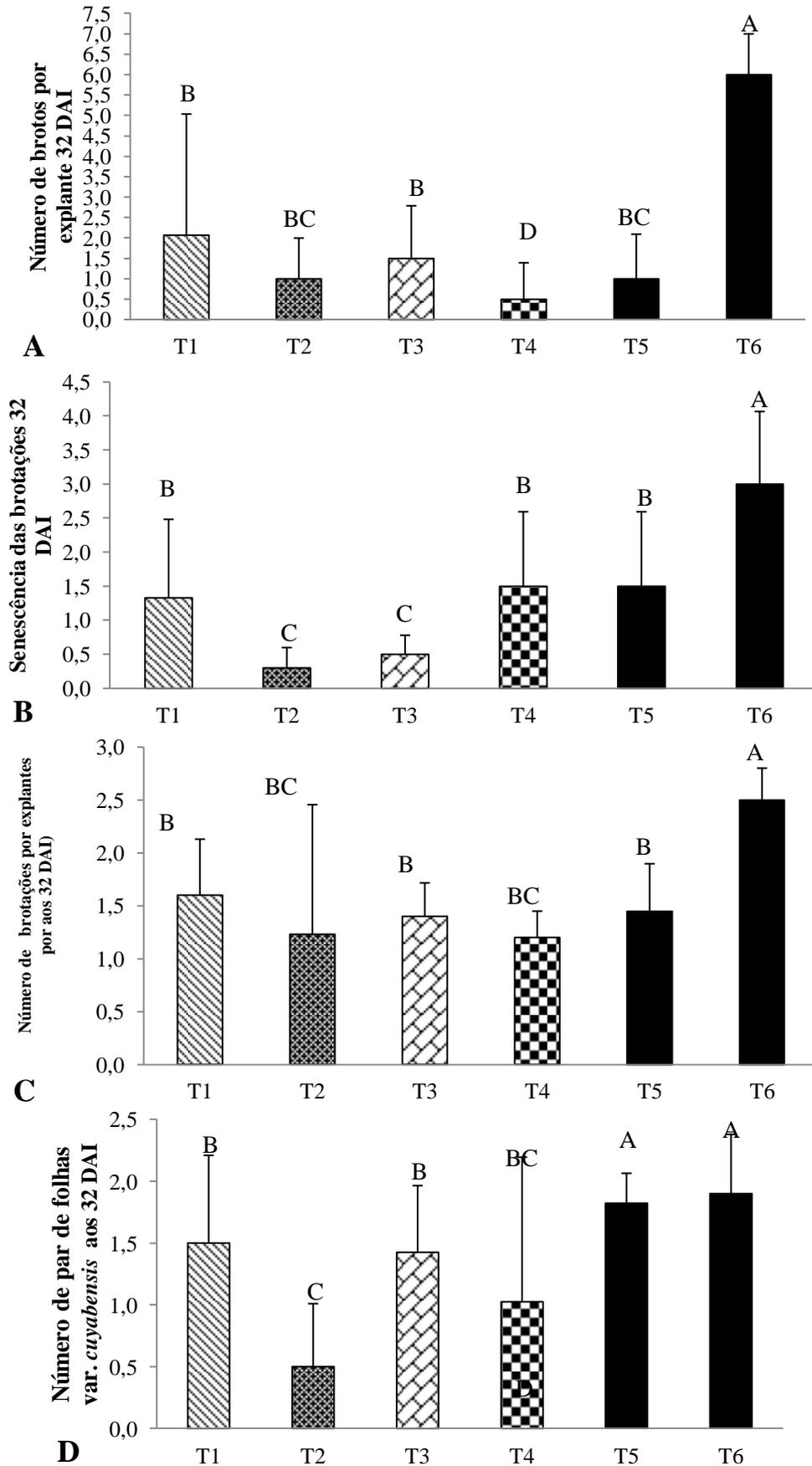
As maiores médias de *H. speciosa* var. *gardneri* quanto ao Brot./Expl., Senes. Brot., Expl./Brot. e NPF (**Figura 5-A, B, C e D**) foi constatada no T6. É possível perceber que a sub. *gardneri*, obteve o melhor desempenho para estes quesitos, com valores de 5,8; 3,0; 2,5 e 1,8 para cada item avaliado.

As maiores médias de *H. speciosa* var. *gardneri* quanto ao Brot./Expl., Senes. Brot., Expl./Brot. e NPF (**Figura 5-A, B, C e D**) foi constatada no T6. É possível perceber que a sub. *gardneri*, obteve o melhor desempenho para estes quesitos, com valores de 5,8; 3,0; 2,5 e 1,8 para cada item avaliado.

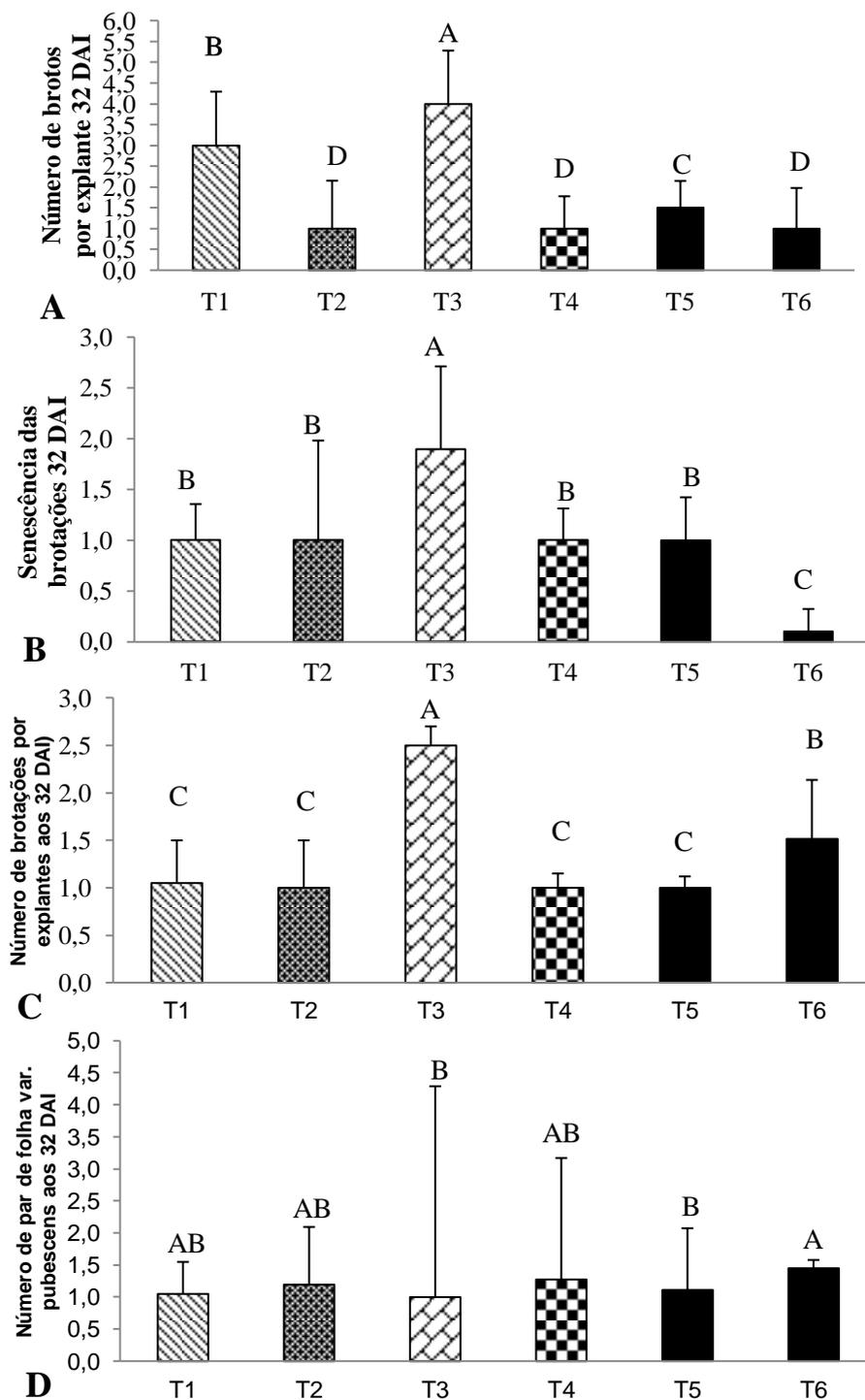
A interação entre o tipo de explante, o genótipo, a composição do meio e as condições do ambiente de cultivo (Grattapaglia & Machado, 1988) são determinantes para o sucesso do cultivo *in vitro* das espécies. Entender essas interações e suas causas é fundamental, pois, os trabalhos com cultura de tecidos podem oportunizar o desenvolvimento de metodologias, para colocar disponíveis ao agricultor familiar mudas de frutíferas de qualidade e com menos tempo para o início da produção.



**Figura 4.** Média e Desvio Padrão de *H. speciosa* var. *cuyabensis* quanto ao: **(A)** - número de brotações por explantes (Brot./Expl.); **(B)** - senescência das brotações (Senes. Brot.); **(C)** - explantes sobreviventes (Expl./Brot.) e; **(D)** - número de par de folhas (NPF), submetidos à desinfecção em diferentes tempos e concentrações de Hipoclorito de Sódio aos 32 após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.



**Figura 5.** Média e Desvio Padrão de *H. speciosa* var. *gardneri* quanto ao: **(A)** - número de brotações por explantes (Brot./Expl.); **(B)** - senescência das brotações (Senes. Brot.); **(C)** - explantes sobreviventes (Expl./Brot.) e; **(D)** - número de par de folhas (NPF), submetidos à desinfecção em diferentes tempos e concentrações de Hipoclorito de Sódio aos 32 após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.



**Figura 6.** Média e Desvio Padrão de *H. speciosa* var. *pubescens* quanto ao: **(A)** - número de brotações por explantes (Brot./Expl.); **(B)** - senescência das brotações (Senes. Brot.); **(C)** - explantes sobreviventes (Expl./Brot.) e; **(D)** - número de par de folhas (NPF), submetidos à desinfecção em diferentes tempos e concentrações de Hipoclorito de Sódio aos 32 após a inoculação (DAI). Goiânia, GO, 2014.

### Conclusão

As diferentes variedades se manifestaram diferentes quanto ao processo de desinfecção e sobrevivência; É possível o cultivo *in vitro* de explantes nodais de *H. speciosa* das variedades *cuyabensis*, *gardneri* e *pubescens*, oriundas do campo.

### Referências

AMORIM, G. O.; RODRIGUES, E. G.; VIEIRA, M. C.; SILVA, G. D.; GUIMARAES, G. R. Eficiência da desinfestação em sementes Mangabeira *Hancornia speciosa* Gomes (Apocinaceae) inoculadas *in vitro* em diferentes concentrações de Hipoclorito de sódio (NaClO). In: XVIII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais & V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos. Joinville, SC, CD-ROOM, 2011.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, n. 19, 303 p, 2010.

BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em Hipoclorito de Sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, vol. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

CASSELS, A. C. Contamination and its impact in tissue culture. **Acta Horticulture**. The Hague, vol. 95 560, p. 353-359, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p.183-260, 1998.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p. 371-393, 1998.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, vol. 15, p. 473-497, 1962.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais Fitofisionomia do Bioma Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. S. (edit.). **Cerrado: Ecologia e flora**. 1 ed. Brasília: Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica. p. 152-212, 2008.

SILVA JÚNIOR, J. F.; LÊDO, A. S. **A cultura da mangaba**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 253, 2006.

SOARES, F. P.; RAÍRYS, R. P.; NOGUEIRA, C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. R. G.; PAIVA, P. D. O. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário**, Lavras, MG, n. 67, p. 1-12, 2007.

VIEIRA, M. C.; WOLSK, P. L. M.; SILVERIO, L.; SAMPAIO, D. M.; SOUZA, D. C. Incidência de agentes contaminantes em estacas lenhosas de amoreira inoculadas *in vitro*. **In: II Simpósio Internacional de Fruticultura e Frutas Exóticas**. Jaboticabal, SP, SINFRUIT. 1 CD-ROOM, 2013.

VIEIRA, M. C. Produção, Fenologia de plantas e morfogênese *in vitro* de diferentes subespécies de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). 208f. **(Tese de Doutorado em Produção Vegetal)**, Universidade Federal de Goiás, Brasil.